

중추신경계 손상 회복에 미치는 대한 조구등의 영향

이진구, 박형진, 김동웅, 송봉근

원광대학교 한의과대학 내과학교실

Received : 09. 02-02

Accepted : 09. 02-16

Key Words:*Uncariae Ramulus et Uncus, CD81, GFAP, MAG, Gliosis, CNS injury, Astrocyte***The Effect of the Uncariae Ramulus et Uncus on the Regeneration Following CNS Injury**

Lee Jin-Goo, Park Hyoung-Jin, Kim Dong-Woong, Song Bong-Keun

Department of Internal Medicine, Wonkwang University Oriental Medical School, Iksan, Korea

ABSTRACT

Objective : Following central nervous system(CNS) injury, inhibitory influences at the site of axonal damage occur. Glial cells become reactive and form a glial scar, gliosis. Also myelin debris such as MAG inhibits axonal regeneration. Astrocyte-rich gliosis relates with up-regulation of GFAP and CD81, and eventually becomes physical and mechanical barrier to axonal regeneration. MAG is one of several endogenous axon regeneration inhibitors that limit recovery from CNS injury and disease. It was reported that molecules that block such inhibitors enhanced axon regeneration and functional recovery. Recently it was reported that treatment with anti-CD81 antibodies enhanced functional recovery in the rat with spinal cord injury. So in this current study, the author investigated the effect of the water extract of Uncariae Ramulus et Uncus on the regulation of CD81, GFAP and MAG that increase when gliosis occurs.

Methods : MTT assay was performed to examine cell viability, and cell-based ELISA, western blot and PCR were used to detect the expression of CD81, GFAP and MAG. Then also immunohistochemistry was performed to confirm in vivo.

Results : Water extract of Uncariae Ramulus et Uncus showed relatively high cell viability at the concentration of 0.05%, 0.1% and 0.5%. The expression of CD81, GFAP and MAG in astrocytes was decreased after the administration of Uncariae Ramulus et Uncus water extract. These results was confirmed in the brain sections following cortical stab injury by immunohistochemistry.

Conclusion : The authors observed that Uncariae Ramulus et Uncus significantly down-regulates the expression of CD81, GFAP and MAG. These results suggest that Uncariae Ramulus et Uncus can be a candidate to regenerate CNS injury.

I. 서론

망막 손상이나 뇌혈관장애나 척수마비와 같은 중추신경계의 손상이 발생되면 신경세포의 괴사와 더불어 성상세포의 증식(gliosis)을 특징으로 하는 반흔(glial scar) 형성이 나타나 신경세포나 축삭의 재생에 물리적 및 분자적인 장벽으로 작용한다. 다른 한편으로는 반흔을 이루고 있는

성상교세포가 축삭의 재생을 억제하는 물질을 생성하여 신경의 재생을 방해한다¹⁾. 이러한 반응은 대부분 비가역적으로 일어나므로 이를 회복하기가 사실상 어렵고 결국 중추신경계의 기능상실로 이어짐으로써 이로 인한 사회경제적 손실 또한 크다고 할 수 있다.

※Correspondence : Song Bong Keun, Department of Internal Medicine, Wonkwang University Oriental Medical School, Iksan, Korea

(Tel 062-670-6422, Fax 062-670-6767) songbk@wonkwang.ac.kr

This Work Was supported by Korea Research Research Fbundation Grant (KRF-2005-E00198)

GFAP(glial fibrillary acidic protein)는 중추신경계 손상 후 일어나는 gliosis 진행시 증가하는 것으로 밝혀졌다^{2,3)}. 이와 더불어 CD81도 같은 양상으로 증가한다^{4,5)}. CD81은 tetraspanin 계에 속하는 표면단백질(transmembrane protein)로 뇌, 척수 및 망막 등의 중추신경계에 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, 중추신경계 손상 후 급격히 발현이 증가한다^{4,6)}. 또한 CD81은 세포의 신호전달경로를 자극하는 세포부착단백질(cell adhesion molecule)과 관련되어 있으며 궁극적으로는 세포의 증식과 이동 재생 등에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다^{7,8)}. 한편 MAG(myelin-associated glycoprotein)는 myelin 억제인자로 초기 수초화(myelination)단계에서는 기능적인 역할을 담당하나 성숙한 이후에는 중추신경계 손상시에 강력한 신경성장 억제인자로 작용한다⁹⁾.

조구등(Uncariae Ramulus et Uncus)은 꼭두서니과 식물로서 고혈압이나 경풍 및 두통에 널리 사용되고 있으며 혈압강하 작용이나 항경련, 진정작용이 있음이 보고되었다. 최근 조구등이 대뇌신경세포와 척수신경세포의 허혈성 손상이나 산화적 손상에 대한 방어효과를 가지고 있음도 보고되고 있다¹⁰⁻¹³⁾.

중추신경계의 신경재생을 촉진하기 위한 다양한 연구¹⁴⁻¹⁶⁾에도 불구하고 아직까지 임상적 유효성이 미흡한 것으로 여겨지고 있다. 다만 최근 연구에 의하면 정상세포에서 GFAP를 제거한 결과 신경의 성장 및 재생이 촉진되었고¹⁷⁾, 실험적으로 척수손상을 가한 쥐에 항 CD81 항체를 투여한 결과 신경이 회복되었다고 보고¹⁸⁾되었다.

이에 저자는 조구등이 신경세포에 대한 산화적 손상이나 허혈성 손상에 보호작용이 있음에 주목하고 중추신경 손상 시 수반하는 gliosis에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포독성을 측정하고, gliosis에 관여하는 CD81과 GFAP, MAG의 발현 변화를 관찰한 바 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재 및 검액 조제

본 실험에 사용한 조구등은 원광대학교 본초학교실에서 구입한 후 정선하여 실험에 사용하였다. 조구등 200g을 증류수 2,000ml에 넣고 3시간 동안 가열하여 추출한 다

음 추출물을 Whatman 필터로 여과한 후 감압기로 농축하였다. 감압 농축한 추출물은 동결 건조하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 Sprague-Dawley계 7주된 숫컷 흰쥐(180-200g)를 다물 사이언스(대전)에서 구입하였으며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포의 배양

생후 8일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 얼음에 넣어서 마취시킨 후에 뇌를 꺼내서 1×HBSS을 넣고 수막을 제거하고 대뇌 피질을 잘게 부순 다음 75cm² flask에 총량이 10ml이 되도록 1×HBSS를 넣고 80rpm, 10분 동안 교반하였다. 여기에 0.1% trypsin이 포함된 20ml 1×HBSS을 첨가해서 약 10-20분 교반하고 10ml pipet을 이용해서 분리시킨 후 70µm strainer를 이용하여 여과하였다.

여과한 세포는 800rpm, 5분 동안 원심분리 하였고 가라앉은 세포에 30ml astrocyte media(20% FBS, 100unit/ml penicillin/streptomycin, 2mM glutamin)를 가하고 75cm² flask에 cell을 seeding하였다. 이후 3-4일에 한번씩 cell culture media(10% FBS, 100unit streptomycin/penicillin, DMEM)를 바꾸어 주면서 세포의 상태를 관찰하여 flask에 세포가 90~100% 자랐을 경우에 0.25% trypsin/EDTA(Hyclon)으로 계대 배양하였다.

2) MTT assay

조구등의 astrocytes에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

조구등extract를 10% FBS의 media에 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도별로 녹인 후에 0.45 filter를 이용해서 여과하였다. 96 well plate의 한 well당 1×10⁴ 개의 astrocytes를 seeding한 후에 준비된 조구등 용액을 농도별로 처리하고 16시간 배양하였다. 배양 후 media를 제거하고, PBS로 한번 씻어준 다음에 5mg/ml 10× MTT 용액을 한 well 당 100µl 씩 넣고 37°C, CO₂ incubator 에서 4시간 배양하였다. 4시간 후에 MTT

solution을 제거하고, PBS로 한번 씻어준 후에 0.2% acid-isopropanol을 100 μ l 넣고 5분간 흔들어 준 다음에 microplate reader(ASYS Hitech GmbH, Austria)를 이용하여 570nm에서 측정하였다.

3) ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

조구등이 astrocytes에서 CD81, GFAP 그리고 MAG 발현에 미치는 영향을 알아 보기위해 cell-based ELISA를 실시하였다.

먼저 96well plate 의 한 well 당 1x10⁴ astrocyte를 seeding 하였다. 세포가 plate에 붙으면 조구등을 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도별로 10%FBS의 media에 녹인 후에, 0.45 filter을 이용해서 filtration하여 세포에 처리한 다음 16시간 배양하였다. 16시간 후 media를 제거하고, PBS 로 한번 씻어준 다음에 100 μ l 3.7% formaldehyde로 상온에서 10분 cell을 고정하였다. 다음 PBS+0.1% Triton X-100(PBST)으로 5분씩 3회 세척하고 PBST+1%BSA 로 상온에서 1시간 locking한 뒤에 1차 항체(1:100)를 PBST+1%BSA에 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBST로 5분씩 3회 세척한 후에 2차 항체를(1:1000)를 동일하게 PBST-1%BSA에 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBST로 2회 세척하고 PBS로 한번 세척하였다. TMB(sigma) 용액을 각 well 당 100 μ l씩 넣고 5분정도 반응 시킨 후에 TMB stop solution(sigma) 100 μ l로 반응을 정지시킨 다음 microplate reader로 450nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4) Western blot

0.5%의 조구등 물추출물을 16시간 전처리한 astrocyte를 PBS로 한 번 세척한 후에, 1ml PBS를 넣고, cell scraper를 이용하여 세포를 수거하여 1.5ml tube에 옮긴 후에, 5000~6000 rpm, 10초간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고, 가라앉은 세포에 2x protein sample buffer를 넣고, 98 $^{\circ}$ C에서 약 10분간 끓이고, 5000-6000 rpm, 10초간 원심분리 하였다. 상층액을 12%~15% SDS-PAGE gel에 loading하여 전개시킨 다음 nitrocellulose membrane에 transfer system(Bio-Rad)을 이용하여 gel에 있는 단백질을 전이하였다.(100volt 0.35A, 1hr.) Nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 RT(room temperature)에서 2시간 반응시키고, 10분씩 2회 TBS-T로 세척하고, HRP가 결합 되어 있는 2차 antibody를 RT에서 1시간 반응 시킨 다음 2차 antibody를

붙인 후에 TBS-T로 10분씩 3회 세척하고, HRP와 반응하는 DAB solution(0.6mg/ml, pH 7.6 Tris-Cl, 3 μ l/ml H₂O₂)에 nitrocellulose membrane을 반응 시켰다.

5) 중추신경 손상 유도

180-200g 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 ketamin/rompun 으로 복강마취 하여 두피를 절개 후에 두개골을 노출시켜서 대뇌 피질에 3mm 깊이의 상처를 만들고 다시 두피를 덮었다. 수술 후 7days, 14days, 30 days 동안 조구등 extract를 0.5g/kg 용량으로 꼬리 정맥 주사로 투여하였다.

7days, 14days, 30 days가 지난 후에, ketamin/rompun 으로 복강마취 한 후에 심장을 통하여 PBS를 관류시킨 다음 4% paraformaldehyde를 주입하고 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde에 넣고 2-3일간 고정시키고, 이후 30% sucrose 용액에 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

6) RT-PCR

적출한 뇌를 Trizol(MRC) 1ml을 넣어서 homogenize하였다. 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm으로 5분 원심분리 한 다음 상층액만 취해서 새 튜브에 옮기고, 옮겨진 상층액에 0.2ml의 chloroform을 넣고 15초 정도 잘 섞이게 흔들어준 다음, 상온에서 15분 반응 시켰다. 다음 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm으로 15분 원심분리 후 상층액만을 취해서 새 튜브에 옮기고 0.5ml의 isopropanol을 넣고 잘 섞이도록 한 후 같은 방법으로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet의 양을 확인하고 10분간 말린 후 DEPC를 처리한 물을 적당량 넣어 55도에서 15분간 녹이고 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 이렇게 해서 얻어진 RNA를 가지고 ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega)을 이용해서 RT-PCR을 수행 (70 $^{\circ}$ C 5분, 4 $^{\circ}$ C 10분, 25 $^{\circ}$ C 5분, 42 $^{\circ}$ C 1시간, 70 $^{\circ}$ C 15분) 하였다. 얻어진 cDNA와 아래와 같은 sequence primer를 사용하여 2X PCR Master mix(Solgent)로 PCR을 수행 (30 cycle, 94 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분)하였다.

PCR 수행 시 사용되어지는 gene들의 primer sequence들은 CD81(5' -CTG TTTGCCTGTGAGGTAGC-3', 5' -TCAGTGTGGTCAGCGTATTG-3'), GFAP(5' -AGGGACAATCTCACACAGGAC-3', 5' -CTCCAGCGACTCAAC CTTC-3'), GAPDH(5' -ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3', 5' -GTTGTC ATGGATGACCT-

TGGCC-3')이었다. 얻어진 PCR product들은 1x TBE buffer에서 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide이 포함된 1% agarose gel에 전기영동 시킨 다음 자외선 발광 장치로 확인하였다.

7) 면역조직화학

중추신경 손상을 유도한 뇌조직을 microtome을 이용하여 30-35 μm 두께로 cryo section 한 뒤에, 24 well plate에서 floating staining하였다.

조직상태에서 단백질의 발현의 관찰은 30-35 μm 두께의 조직을 BBS로 2회 세척하고, pre-incubation Buffer (2% BSA, 0.05% triton X-100 in BBS)로 30분간 반응시켰다. 반응 후에 1차 antibody(1:100~200)을 0.4% BSA를 포함한 BBS에 희석하여 조직을 RT에서 2시간 shaking 하면서 반응시키고 난 뒤에 BBS로 2회 세척하고 HRP가 결합되어 있는 2차 antibody(1:2000)을 0.4% BSA가 포함된 BBS에 희석하여 RT에서 2시간 반응시켰다. 다음 조직을 세척하고 DAB solution (1mg/ml, pH7.6 Tris-Cl)에 H_2O_2 (3 $\mu\text{l/ml}$)를 첨가하여 반응시킨 다음 PBS로 세척하여 반응을 정지시켰다. 염색된 조직을 slide에 mounting하고 cover glass로 덮은 다음 현미경으로, 단백질의 발현을 관찰하였다.

8) 통계분석

모든 결과는 평균값 \pm 표준오차로 나타냈으며, 대조군과의 평균값 비교를 위해서 Student's paired T-test를 실시하였으며 통계적 유의성을 위한 유의수준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

III. 결과

1. 조구등의 세포 독성

조구등의 세포독성 유무를 관찰하기 위하여 astrocytes에 각각 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도의 조구등 물추출물을 16시간 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 0.05% 조구등 물추출물에서 98%, 0.1%에서 90%, 0.5%에서 72%의 세포 생존률을 보였고, 1%에서 26%, 5%에서 19%, 10%에서 10%의 비교적 낮은 세포 생존률을 보였다 (Fig. 1).

2. 조구등의 astrocyte에서의 신경 재생 조절인자에 미치는 효과

조구등이 신경 재생에 관여하는 CD81, GFAP 그리고 MAG의 발현에 대한 영향을 알아보기 위해 각 농도의 조구등 물추출물을 astrocyte에 16시간 전처리한 후 cell-based ELISA 방법으로 정량적 분석을 하였다. 그 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) CD81의 발현

조구등 물추출물을 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 처리한 군의 경우 CD81 발현은 모든 농도에서 유의하게 감소하였고 특히 0.05%와 0.1%에서 감소가 더욱 현저하였다 (Fig. 2).

2) GFAP의 발현

조구등 물추출물을 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 처리한 군의 경우 GFAP 발현은 0.05%를 제외한 모든 농도에서 유의성 있게 감소하였고 특히 0.5%와 0.1%에서 감소가 더욱 현저하였다 (Fig 3).

3) MAG의 발현

조구등 물추출물을 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 처리한 군의 경우 모든 농도에서 MAG의 발현이 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 4).

3. 조구등의 astrocyte에서의 gliosis 억제 효과

조구등 물추출물이 CD81과 GFAP의 발현에 미치는 영향을 단백질 수준에서 살펴보고자 astrocyte에 0.5% 조구등 물추출물을 16시간 전처리한 후 western blotting을 실시하였다. 그 결과 조구등 물추출물은 CD81과 GFAP 발현을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 5).

4. 조구등의 RNA 발현에 미치는 영향

조구등 물추출물이 CD81과 GFAP의 발현 감소를 나타냄으로 이런 감소가 RNA의 감소에 기인한 것인지를 관찰하고자 대뇌에 손상을 입힌 흰쥐에 조구등 extract를 0.5g/kg 투여하고 14일 및 30일 후에 뇌조직을 적출하여 RT-PCR을 실시하였으며 결과는 다음과 같았다 (Fig. 6). 즉 CD81과 GFAP의 발현은 감소하였으며 14일에 비하여 30일에 더욱 감소가 두드러졌다.

5. 조구등의 뇌손상에 미치는 영향

손상된 흰쥐의 뇌조직에서 조구등 물추출물이 CD81, GFAP, 그리고 MAG의 발현에 대한 영향을 알아보고자 면역조직화학을 실시하였다.

흰쥐의 대뇌 피질에 3mm 깊이의 손상을 가한 후 조구등 물추출물을 투여하고 7일과 30일 후에 뇌조직을 적출하여 현미경으로 CD81, GFAP 그리고 MAG의 발현을 관찰하였다 (Fig. 7). 그 결과 CD81과 GFAP 및 MAG의 발현이 감소됨을 관찰하였으며 손상 후 7일째에 비하여 손상 후 30일째에서 더욱 감소가 두드러지는 것으로 나타났다.

IV. 고찰

중추신경계의 축삭 재생 결여의 주원인은 신경교 세포의 억제성 특성에 기인한다. 특히 중추신경계 손상시 신경교 반흔(glial scar)의 생성으로 축삭 성장체(axonal growth cone)의 성장이 좌절되고 신경교 반흔 자체가 구조적 장벽을 형성하여 성장억제 요인으로 작용한다. 정상교세포는 다른 환경적 조건과 자극에 반응하여 성장 촉진 요인 또는 성장 억제 요인으로 작용하여 중추신경계 손상시 주위 세포의 물질들과 치밀하게 결합하여 GFAP의 발현을 특징으로 하는 교세포화(gliosis)를 생성하고^{2,3} 결과적으로 신경재생을 억제함이 확인되었다¹. 또한 치밀한 결합구조를 지닌 신경교 반흔의 조직 배양 실험을 통한 연구에서도 이들 구조에 의한 중추신경계 축삭 재생 억제 현상이 확인되었다^{19,20}. 한편으로 astrocyte에서 GFAP를 제거한 결과 신경의 성장 및 재생이 촉진되었다고 보고¹⁷되었다.

CD81은 tetraspanin계에 속하는 표면단백질(transmembrane protein)이다^{8,21,22}. 이들 tetraspanin은 세포막에서 molecular complex를 형성하여 다른 cell adhesion molecules과 같은 molecule들과 관계를 형성한다²². 이러한 complexes는 세포의 바깥 표면에서 일어나는 second messenger system에 연결을 통해^{7,23} 부착, 이동 그리고 증식 등과 같은 세포의 행동을 조절하는 것으로 보인다⁸. CD81은 원래 TAPA(Target of the antiproliferative antibody)라고도 불렸으며²⁴ 이 용어가 암시하는 것과 같이 세포표면에 있는 CD81의 epitope에 대응하는 antiproliferative antibody가 세포주기의 진행을 억제한다^{4,24,25}. CD81이 세포성장에 대한 조절을 한다는 보다 확

실한 증거는 CD81이 결여된 생쥐의 뇌가 보통 생쥐의 뇌보다 더 크며 정상세포와 microglial cell을 유의하게 많이 포함하고 있다는 연구에 기인한다²⁵. 또한, 최근에 척수에 손상을 가하고 손상부위에 antibody against CD81를 지속적으로 주입하여 기능회복과 조직손상을 보호하였다는 보고가 있었다¹⁸.

또한 중추신경계의 회복을 방해하는 요소로서 myelin 억제제들의 관련도 최근 연구되고 있다. 이러한 억제요소로는 myelin-associated glycoprotein (MAG), Nogo 및 oligodendrocyte-myelin glycoprotein(Omgp)등이 밝혀지고 있다. 이중 MAG는 신경성장 억제성물질로서 희돌기교세포에서 분리 동정되었다^{9,26}. 이들 물질은 면역글로불린 유전자 상과군(immunoglobulin gene superfamily)으로 구분되고²⁷ 초기 수초화(myelination)단계에서는 기능적인 역할을 담당하나²⁸ 성숙한 이후에는 중추신경계 손상시에 강력한 신경성장 억제인자로 작용하며 cAMP 의존성 기전에 의해 조절 된다⁹.

따라서 이러한 일련의 연구를 바탕으로 gliosis와 관련되어 있는 GFAP와 CD81 및 신경재생 억제인자인 MAG의 발현 억제를 통하여 신경재생을 조절할 수 있으리라는 추론이 가능하다.

조구등(Uncariae Ramulus et Uncus)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 鉤藤(Uncaria rhynchophylla) 또는 大葉鉤藤(U. macrophylla), 華鉤藤(U. sinensis), 毛鉤藤(U. hirsuta), 無柄果鉤藤(U. sessifructus)의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 찌서 건조한 藥材이다. 性味가 甘苦微寒 無毒하고 淸熱, 平肝, 熄風, 鎮驚의 효능이 있어 中風癱瘓, 四肢麻痺, 口顏喎斜, 頭昏目眩, 驚癇, 筋脈拘攣, 客忤胎風, 小兒驚 등의 제 증상에 사용되어 왔다¹¹⁻¹³.

조구등의 주요성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 isorhynchophylline, corynoxine, isocorynoxine, corynantheine, dihydrocorynantheine, hirsutine, hirsuteine 등의 alkaloid 성분들이 주로 함유되어 있다²⁹.

조구등의 생리활성에 대한 연구로는 동물모델에서 alkaloid성분의 혈압강하 혹은 혈관확장 작용에 관한 것이 다수 보고되었고³⁰⁻³², 鎮痛, 鎮靜, 항경련 작용에 대한 실험적 연구 결과도 보고되었다³³.

한편 조구등이 신경세포나 중추신경의 손상에 대한 보호 작용도 최근 보고되고 있다. Itoh et al³⁴과 Shimada et al^{35,36}은 glutamate에 의해 유도된 소뇌의 granule

cell의 neuronal death에 대해 조구등이 세포내로의 Ca^{2+} 의 유입을 억제함으로써 세포보호효과를 나타냄을 보고하였다. 또한 혈관성치매환자 60명에 대한 대조군 연구에서 조구등이 주된 재료로 함유된 鈎藤散이 임상 증상을 개선시켰다고 보고³⁴⁾되었다. 아울러 조구등이 H_2O_2 로 유도된 척수감각신경절세포의 산화적 손상에 대해 보호 작용이 있음이 관찰³⁷⁾되었고, glucose oxidase로 유도된 대뇌신경세포의 산화적 손상에 대해 보호 작용이 있음도 보고³⁸⁾되었다. 이밖에도 조구등은 치매의 원인 인자로 부각되고 있는 CT105 단백질의 절편을 이용한 신경세포 손상 실험에서 신경 보호 효과가 있음을 보고¹⁰⁾되었다. 조구등은 뇌동맥을 결찰하여 뇌의 허혈 손상을 유도한 후에 조구등이 해마의 신경세포에 대해 보호 작용이 있는 것으로 나타났다^{11,12)}. Kim et al¹³⁾은 ibotenic acid로 흰쥐에서 기억상실증을 유도한 후 조구등이 기억을 향상시키고 septohippocampal cholinergic cell의 손상을 보호하는 효과가 있음을 보고 하였다.

이상의 연구 결과를 살펴보면 조구등은 혈압강하 작용과 진정 항경련 진통 작용이 있음이 입증되었고, 최근 신경세포나 중추신경 조직에서 산화적 손상이나 허혈성 손상 등에 대해 보호 효과가 있음이 밝혀지고 있다.

이에 저자는 조구등의 신경세포에 대한 작용에 주목하고 중추신경 손상시 수반하는 교세포화도 미치는 영향을 조사하였다. 신생 흰쥐에서 얻은 성상세포를 배양하여 세포독성을 측정하고, 교세포화에 관여하는 CD81과 GFAP, MAG의 발현 변화에 대해 세포수준에서 정량적 관찰을 하고, 면역염색법으로 확인하였으며, RNA수준에서 변화도 측정을 하였다. 한편 흰쥐를 이용한 동물실험을 통하여 조직학적 관찰도 병행하였다.

세포독성시험에서 농도 의존적으로 세포독성이 관찰되었으며 0.5%이하의 농도에서 비교적 낮은 세포 독성을 보이므로 적정실험 농도를 0.5%로 정하였다.

Cell based ELISA는 Western blot에 비하여 짧은 시간에 많은 양의 실험을 할 수 있으며 정량적인 결과를 얻을 수 있는 실험방법이다. 따라서 본 실험에서는 조구등 물추출물을 다양한 농도로 처리하여 CD81, GFAP, MAG의 발현을 관찰하였다. CD81과 GFAP는 대부분 농도에서 유의하게 감소하는 경향이 있었고, MAG도 유의성은 없었으나 감소하였다. 단백질의 발현은 RNA의 작용에 의한 것이므로 RNA 수준에서 변화를 측정하기 위해 RT PCR을 시행 하였다. PCR 결과 조구등 물추출물이 CD81과 GFAP의 발현을 RNA수준에서 감소시켰

으며, 14일에 비하여 30일에 더욱 감소가 두드러졌다. 따라서 Cell based ELISA나 Wester blot에서 관찰한 CD81, GFAP의 발현감소현상은 RNA의 감소에 기인한 것으로 생각된다.

이와 같이 세포에서 관찰한 조구등의 효과를 동물에서 확인하기 위해 인위적으로 대뇌에 stab injury를 가하여 실험 모델을 만들고 조구등을 투여하여 대조군과 손상부위를 비교하였다. 대조군에 비해 CD81, GFAP, MAG이 비교적 적게 발현하였고 시간이 경과할수록 더욱 감소하는 경향이 있었다.

이상의 결과를 보아 조구등은 중추신경계 손상 후 교세포화를 유도하는 CD81, GFAP, MAG를 RNA 단계에서 감소키는 기전에 의하여 중추신경계 손상 후 회복에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 아울러 향후 지속적인 연구를 통하여 조구등이 망막 손상이나 대뇌 및 척수 손상과 같은 중추신경계 손상의 회복 조절에 기여할 수 있으리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 중추신경계 손상시 나타나는 CD81과 GFAP, MAG의 발현에 대하여 조구등이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 신경세포를 배양하여 시험관분석에 의한 조사와 흰쥐를 이용한 동물실험을 실시하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조구등 물추출물의 세포독성을 관찰한 결과 0.05% 조구등 물추출물에서 98%, 0.1%에서 90%, 0.5%에서 72%의 비교적 높은 세포 생존률을 보였다
2. 조구등 물추출물은 Astrocytes에서 cell-ELISA로 분석한 결과 CD81과 GFAP의 발현을 유의하게 감소시켰으며, MAG도 유의성은 없었으나 발현을 감소시켰다.
3. 성상세포에서 분리한 단백질을 western blot으로 분석한 결과 CD81과 GFAP의 양이 감소하였다.
4. PCR 결과 조구등 물추출물이 CD81과 GFAP의 발현을 RNA수준에서 감소시켰으며, 14일에 비하여 30일에 더욱 감소가 두드러졌다.

5. 대뇌에 손상을 입은 흰쥐에서 조구등 물추출물 투여는 CD81, GFAP, MAG의 발현 감소를 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 조구등은 중추신경 손상시 CD81과 GFAP, MAG의 발현을 감소시켜 gliosis를 억제하는 작용이 있는 것으로 생각되며 향후 중추신경손상의 회복에 활용될 수 있는 가능성을 시사 한다고 생각된다.

VI. 참고문헌

- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci.* 1991;11(11):3398-3411.
- Eng LF, Reier PJ, Houle JD. Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res.* 1987;71:439-455.
- Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-391.
- Geisert EE, Jr, Yang L, Irwin MH. Astrocyte growth, reactivity, and the target of the antiproliferative antibody, TAPA. *J Neurosci.* 1996;16:5478-5487.
- Song BK, Geisert GR, Vazquez-Chona F, Geisert EE Jr. Temporal regulation of CD81 following retinal injury in the rat. *Neurosci Lett.* 2003;338(1):29-32.
- Geisert EE Jr, Abel HJ, Fan L, Geisert GR. Retinal pigment epithelium of the rat express CD81, the target of the anti-proliferative antibody (TAPA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(1):274-280.
- Bereditchevski, F, Toliass, KF, Wong, K, Carpenter, CL, Hemler, ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase *J Biol Chem.* 1997;272:2595-2598
- Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol.* 2001;155(7):1103-1107.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron.* 1999;22(1):89-101.
- Kim ST, Kim JD, Lyu YS, Lee MY, Kang HW. Neuroprotective effect of some plant extracts in cultured CT105-induced PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(10):2021-2024.
- Suk K, Kim SY, Leem K, Kim YO, Park SY, Hur J, Baek J, Lee KJ, Zheng HZ, Kim H. Neuroprotection by methanol extract of *Uncaria rhynchophylla* against global cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 2002;70(21):2467-2480.
- Lee B, Choi Y, Kim H, Kim SY, Hahm DH, Lee HJ, Shim I. Protective effects of methanol extract of *Acori graminei rhizoma* and *Uncariae Ramulus et Uncus* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments in the rat. *Life Sci.* 2003;74(4):435-450.
- Kim JH, Chung JY, Lee YJ, Park S, Kim JH, Hahm DH, Lee HJ, Shim I. Effects of methanol extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* on ibotenic acid-induced amnesia in the rat. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(3):314-323.
- Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1995;134(2):261-272
- Ye JH, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol.* 1997;143(1):70-81.
- Broude E, McAtee M, Kelley MS, Bregman BS. Fetal spinal cord transplants and exoge-

- nous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 1999;155(1):65-78.
17. Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia.* 2000;31(3):267-272
18. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FP, Veldman H, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA, Geisert EE Jr. Intraspinal administration of an antibody against CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2006;202(1):57-66.
19. Fawcett JW, Housden E, Smith-Thomas L, Meyer RL. The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev Biol.* 1989;135(2):449-458.
20. McKeon RJ, Hoke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol.* 1995;136(1):32-43.
21. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:89-109.
22. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(9):1189-1205.
23. Schick MR, Nguyen VQ, Levy S. Anti-TAPA-1 antibodies induce protein tyrosine phosphorylation that is prevented by increasing intracellular thiol levels. *J Immunol.* 1993;151(4):1918-1925.
24. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins *Mol Cell Biol* 1990;10:4007-4015
25. Geisert EE Jr, Williams RW, Geisert GR, Fan L, Asbury AM, Maecker HT, Deng J, Levy S. Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *J Comp Neurol.* 2002;453(1):22-32.
26. Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 1994;13(3):757-767.
27. Arquint M, Roder J, Chia LS, Down J, Wilkinson D, Bayley H, Braun P, Dunn R. Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(2):600-604.
28. Owens GC, Bunge RP. Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin. *Neuron.* 1991;7(4):565-575.
29. Ozaki Y. Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Yakurigaku Zasshi.* 1989;94(1):17-26.
30. Chang P, Koh YK, Geh SL, Soepadmo E, Goh SH, Wong AK. Cardiovascular effects in the rat of dihydrocorynantheine isolated from *Uncaria callophylla*. *J Ethnopharmacol.* 1989;25(2):213-215.
31. Goto H, Sakakibara I, Shimada Y, Kasahara Y, Terasawa K. Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae ramulus* on isolated rat aorta. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):197-203.
32. Shi JS, Yu JX, Chen XP, Xu RX. Pharmacological actions of *Uncaria* alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24(2):97-101.
33. Hsieh CL, Chen MF, Li TC, Li SC, Tang NY, Hsieh CT, Pon CZ, Lin JG. Anticonvulsant effect of *Uncaria rhynchophylla* (Miq) Jack. in rats with kainic acid-induced epileptic seizure. *Am J Chin Med.* 1999;27(2):257-264.
34. Itoh T, Shimada Y, Terasawa K. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of

Uncaria sinensis on glutamate-induced neuronal death. *Mech Ageing Dev.* 1999;111(2-3):155-173.

35. Shimada Y, Goto H, Itoh T, Sakakibara I, Kubo M, Sasaki H, Terasawa K. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51(6):715-722.
36. Shimada Y, Goto H, Kogure T, Shibahara N, Sakakibara I, Sasaki H, Terasawa K. Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am J Chin Med.* 2001;29(1):173-180.
37. Kang HW, Park JS, Ryu YS, Chung JM, Lee GM. A study on the effect of *Ramulus et Uncus uncaria* (REUU) on the cultured spinal dorsal root ganglion neurons damaged by oxygen free radicals. *J Oriental Neuropsychiatry* 2000;11(1):1-18.
38. Lee BC, Lee JK, Lee KC, Jeong JG, Lee GM, Shin MK, Song HJ. Effect of *Ramulus et Uncus Uncariae* on the oxidative stress in cultured mouse cerebral neurons. *The Korea J Herbology* 2003;18(3):27-31.

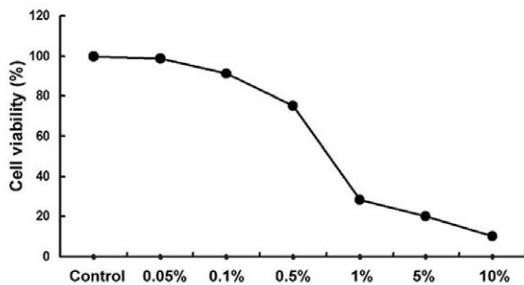


Fig 1. The effect of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*) on the MTT assay. The administration of water extract of *Uncariae* showed about 98% of cell viability at 0.05%, 90% at 0.1% and 72% at 0.5%. Cell viability was decreased to 26%, 19% and 10% at 1%, 5% and 10% concentration respectively.

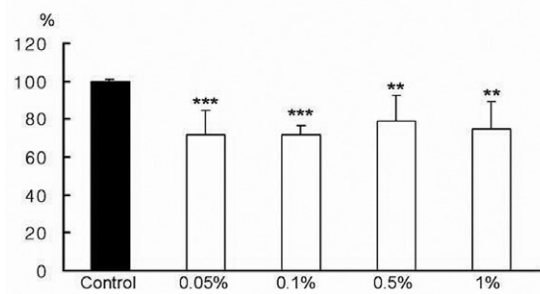


Fig 2. The effect of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*) on the expression of CD81. The administration of *Uncariae* significantly decreased the CD81 expression. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

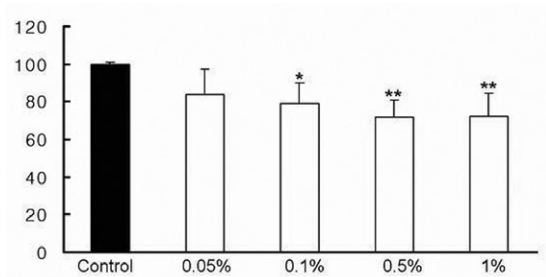


Fig 3. The effect of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*) on the expression of GFAP. The administration of *Uncariae* significantly decreased the expression of GFAP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

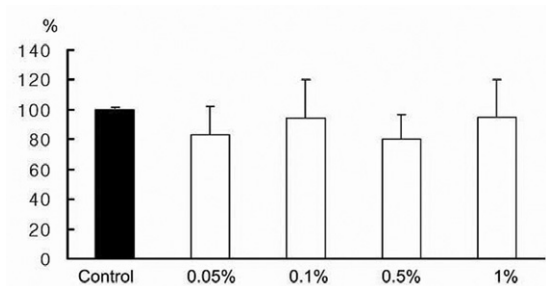


Fig 4. The effect of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*) on the expression of MAG. The administration of *Uncariae* decreased the expression of MAG without significance.

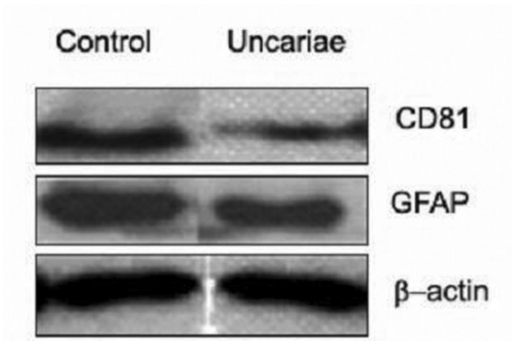


Fig 5. The expression of CD81 and GFAP after administration of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*). The level of CD81 and GFAP was down regulated after the *Uncariae* administration. The cells were pretreated with 0.5% of the extract for 16 hours.

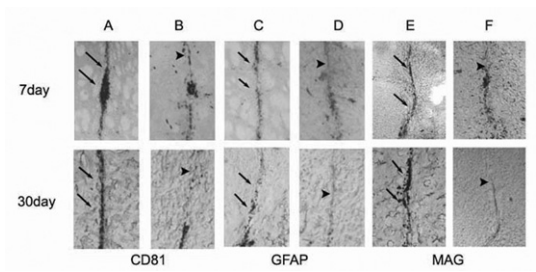


Fig 7. The effect of the water extract of *Ginseng radix* on the expression of CD81, GFAP and MAG at the 7th and the 30th day following cortical stab injury. All the protein immunoreactivity (B, D, F) at the site of stab wound shows the down regulation compared with the control (A, C, E). The wound lesions are seen at the control (arrow) and the experiment (arrowhead) group.

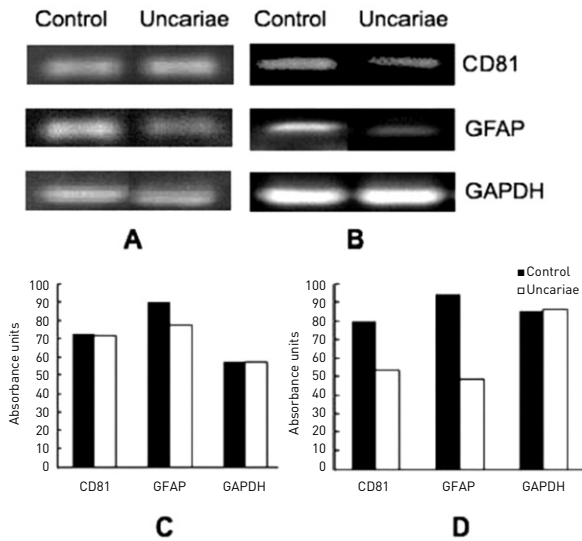


Fig 6. The effect of the water extract of *Uncariae ramulus et uncus* (*Uncariae*) on the RNA expression of CD81 and GFAP. Rats were stab injured at the cortex and the water extract of *Uncariae* was administrated for 30 days and RNA was extracted and amplified by PCR. The expression of CD81 and GFAP was decreased at the 14th (A) and 30th day (B) following cortical stab injury. The level of each RNA expression compared using ImageJ and documented into graph at 14th (C) and 30th day (D).